

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590290

研究課題名（和文） ミトコンドリアタンパク質と性ホルモンによる代謝制御機構の研究

研究課題名（英文） Study for metabolic regulatory mechanism by a mitochondrial protein and a sex hormone

研究代表者

遠藤 仁司 (ENDO HITOSHI)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：50221817

研究成果の概要（和文）：ミトコンドリア内膜に存在するプロヒビチン2（PHB2）はエストロゲン（E2）依存的に核に移行する。一方、E2の減少は閉経早期の閉経後肥満の原因となる。本研究では、E2によって核へ移行したPHB2が、PGC-1 $\alpha$ を介してPPAR $\gamma$ の転写活性を抑制することにより脂肪分化を負に制御することを示した。E2は脂肪前駆細胞において内在性のPHB2を核に移行させ、PHB2はPGC-1 $\alpha$ に直接結合してPPAR $\gamma$ の転写活性を抑制する。ミトコンドリア移行シグナルを欠失したPHB2変異体（PHB2C）を脂肪前駆細胞に発現させると、E2非依存的に脂肪分化を抑制した。閉経後肥満のモデルマウスである卵巣摘出マウスでは、増大した脂肪細胞のミトコンドリアに局在したPHB2が、E2(+)食にて肥満の解消した脂肪組織では核に局在した。以上の結果は、E2がミトコンドリアタンパク質を介して肥満を抑制することを示している。

研究成果の概要（英文）：Prohibitin 2 (PHB2) has been reported as a multifunctional protein that mainly localizes in mitochondria and translocates into nucleus in the presence of estrogen receptor and estrogen. Decrease of estrogen level is a major cause of obesity in early post-menopausal women. In this project, we show that PHB2 in nucleus binds to PPAR $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) and represses its activity, which resulted in inhibition of PPAR $\gamma$  activity. In preadipocytes, 17 $\beta$ -estradiol (E2) led to translocation of endogenous PHB2 from mitochondria into nucleus and inhibition of adipogenesis. Transduction of mitochondrial targeting sequence-deficient PHB2 mutant (PHBC), which is able to translocate into nucleus without E2, inhibited adipogenesis of preadipocytes in the absence of E2. In ovariectomized mice, a model of post-menopausal obesity, E2 treatment decreased adiposity and induced nuclear translocation of PHB2 in white adipose tissues. These results indicate the importance of mitochondrial protein PHB2 in inhibition of adipogenesis and obesity by estrogen.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：ミトコンドリア、プロヒビチン、性ホルモン、核-ミトコンドリア連関、脂肪分化

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 肥満などの生活習慣病は高齢化社会における重要な課題である。エストロゲンは、生殖系分化や乳がん増殖に関する作用以外に、骨質量維持に関する作用やメタボリックシンドロームに関する代謝性の作用がある。エストロゲンの産生を阻害するアロマターゼ欠損マウスにおいて、体重増加・脂肪増加が生じる。エストロゲンレセプター欠失マウスにおいても脂肪組織の増大が認められる。また、ヒトアロマターゼ欠損症においてもインスリン抵抗性の糖尿病や、特に男性においては脂肪肝が生じる。閉経後の女性は肥満し体重増加を示すが、ホルモン補充療法により解消する。しかしながら、これらの代謝性作用におけるエストロゲンの詳細な作用機序は明らかでない。

(2) ミトコンドリア機能が、肥満を含む多くの代謝性疾患に多大な影響を与える事は知られているものの、その具体的な、肥満とミトコンドリア機能を調節するメカニズムに関してはあまり明らかではない。近年我々は、主にミトコンドリアに存在する多機能タンパク質（プロヒビチン2、PHB2）がミトコンドリアと核において重要な機能を果たし、かつエストロゲンレセプター存在下においてエストロゲン依存的に核-ミトコンドリア間をシャトルするという新規な現象を報告した（*J. Biol. Chem.* 281: 36401, 2006）。この分子は、一分子でミトコンドリア機能と核機能を共役できる可能性のある初めての分子であり「核-ミトコンドリア連携」機構の新しい概念を構築する最適なモデルを提示している。

(3) PHB1やPHB2がミトコンドリアにおいて重要な機能を果たしており、膜電位調節・ミトコンドリア膜形態の調節・抗アポトーシスタンパク質の安定化の作用（*J. Biol. Chem.* 281: 36401, 2006）に加え、近年、ミトコンドリアヌクレオイドの構成因子として、ミトコンドリアDNAの構造維持と安定性に働くことを報告した（*Exp. Cell Res.* 314: 988, 2008）。性ホルモンは肥満などの代謝調節に関与することが報告されており、またPHBタンパク質の局在を調節することが報告された。性ホルモンによるPHBタンパク質の局在性変化は、ミトコンドリア機能への影響と核機能への影響が考えられる。これらの局在性の調節と肥満調節の関連性を確かめ、この分子調節機構を明らかにするためには、PHB2の核機能を明らかにすることが必要不可欠である。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究では、PHBタンパク質が性ホルモン依存的に核-ミトコンドリア間を移行するという新規な現象を踏まえ、この現象によりもたらされると予測されるミトコンドリア活性調節および核内における転写活性調節の解析により、性ホルモンが肥満等の代謝調節に関与する分子メカニズムを生化学的に解明する。

(2) 本研究を遂行するため具体的にはまず、①閉経後肥満を試験管内実験系で外挿する目的で、性ホルモンが脂肪細胞の分化を制御する細胞培養系を確立する。②本培養系でPHB2のエストロゲンによるミトコンドリアから核への移行を検討する。③PHB2の核局在が脂肪分化に与える影響を明らかにする。さらに④PHB2の細胞内局在の調節が、マウスの白色脂肪組織でも生じていることを検証する。以上の研究を行うことにより、PHB2の核-ミトコンドリア間の局在性の調節が肥満という生理機能調節と密接に連携していることを証明することができる。そして、PHB2のモデルを用いて「一分子でミトコンドリア機能と核機能を共役する」という「核-ミトコンドリア連携」の概念の最適なモデルを提示することが可能と思われる。

## 3. 研究の方法

(1) 細胞培養：脂肪分化の実験には、脂肪前駆細胞3T3-L1を用いた。培地にデキサメタゾン、IBMX、インスリンを添加し、脂肪細胞への分化誘導を行った。oilred O染色にて、脂肪分化にて生成された脂肪滴を染色し、これを抽出して定量した。ルシフェラーゼアッセイなどの用途にはHeLa細胞を用いた。

(2) ルシフェラーゼアッセイ: Renilla luciferase 遺伝子を内部標準コントロールとしたDual Luciferase assay法を用いた。レポーター遺伝子としてTK-PPRE-Luc 遺伝子またはTK-GAL4-Luc 遺伝子を用いた。

(3) 細胞免疫染色法：培養細胞をPFAで固定し、TritonX100で透過処理した後、抗PHB2抗体および蛍光標識抗体を用いて染色した。検出は共焦点レーザー顕微鏡を用いた。

(4) GST-pulldown アッセイ：大腸菌で作製したGST-PHB2タンパク質およびその欠失変異体を精製し、試験管内でmycタグ付きhPGC-1 $\alpha$ を発現させたHeLa細胞抽出液を用いて、結合実験を行った。検出は、ウェスタンブロット法を用いた。

(5) 遺伝子導入法：HeLa細胞へのプラスミドDNAの遺伝子導入は、リポフェクション法に

て実施した。3T3-L1 細胞への遺伝子導入は、レンチウイルスベクターを用いて実施した。さらに、レンチウイルスベクターで導入した場合は、薬剤選択マーカーとしてプラスチジン耐性遺伝子を用いた。

(6)動物実験：動物実験は本学動物実験委員会の承認を受け実施した。C57BL/6J マウスを用いて、麻酔下にて卵巣切除し、E2 添加食および未添加食を用いて飼育した。腹部 CT は麻酔下にて実施した。実験後安楽死処置を行い、白色脂肪組織を採取した後組織学的解析を行った。

#### 4. 研究成果

(1)培養細胞を用いた実験の結果、まず脂肪前駆細胞 3T3-L1 を用いた細胞免疫染色法では、エストロゲンの添加で内在性の PHB2 はミトコンドリアから一部核へ移行することを示した(図 1 B)。また、3T3-L1 細胞を分化培地(DM)にて7日間分化誘導すると、エストロゲンの添加では脂肪分化を阻害することを示した(図 1 A)。

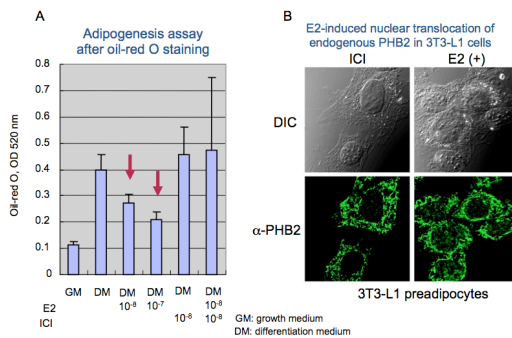


図1. E2は3T3-L1細胞の脂肪分化を抑制する

(2)HeLa 細胞を用いたルシフェラーゼアッセイを施行した結果、脂肪分化を誘導する転写因子 PPAR $\gamma$ とそのコアクチベーターPGC-1 $\alpha$ を用いたルシフェラーゼアッセイの結果、PHB2はPGC-1 $\alpha$ の活性を阻害し、結果としてPPAR $\gamma$ の転写活性を阻害することを示した(図 2)。

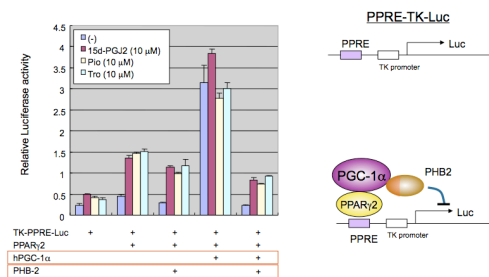


図2 PHB2はPGC-1 $\alpha$ のcoactivator活性を抑制する

また、GAL4-Luc をレポーター遺伝子として、GAL4-DBD-PGC-1 $\alpha$ を用いてルシフェラーゼアッセイを行い、PHB2がPGC-1 $\alpha$ の活性を直接抑制することを示した。

(3)GST-pulldown 法にて、大腸菌にて産生した GST-PHB2 およびその欠失変異体を用いて、myc タグ付き hPGC-1 $\alpha$ を発現させた HeLa 細胞抽出液との結合を検出したところ、PHB2はPGC-1 $\alpha$ に結合することを示した。以上から、PHB2は直接PGC-1 $\alpha$ に結合し、その活性を抑制して PPAR $\gamma$ の転写活性を抑制することを示した。

(4)さらに、3T3-L1 細胞にレンチウイルスにてミトコンドリア移行シグナルを欠失した PHB2 の変異体 (PHB2C) を導入した細胞を製作した(図 3)。

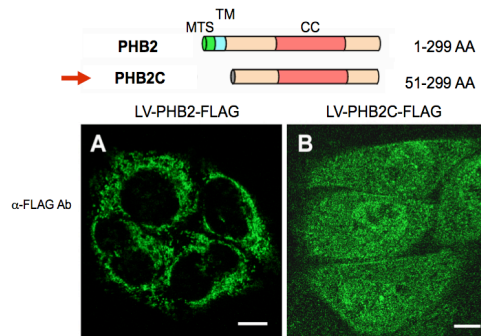


図3 ミトコンドリア移行シグナル(MTS)を欠失したPHB2は核へ移行する。

(5)この細胞を用いて、脂肪分化誘導を試みたところ、エストロゲンに非依存的に脂肪分化が抑制された(図 4)。このことから、脂肪細胞においてはPHB2の核移行がPGC-1 $\alpha$ の活性抑制を介して PPAR $\gamma$ の活性を抑制することにより、脂肪分化を抑制することを示した。

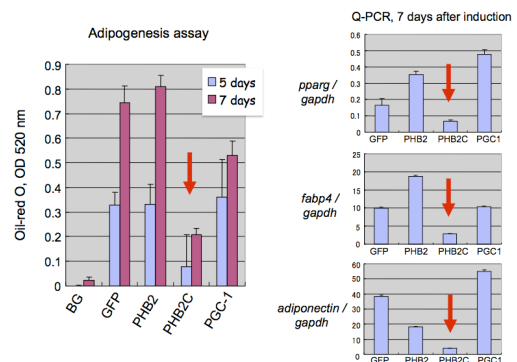


図4 核移行型PHB2CはE2非依存的に脂肪分化を抑制する

(6)この仮説が生体に外挿可能か否かを検討するために、卵巣摘出を実施したマウス(OVXマウス)を用いて PHB2 の挙動を検討した。OVX

マウスは閉経後肥満のモデルマウスである。OVX マウスにおいて白色脂肪組織における脂肪細胞の増大が生じるが、エストロゲン添加食の投与によって体重および内蔵脂肪は減少した (図 5)。

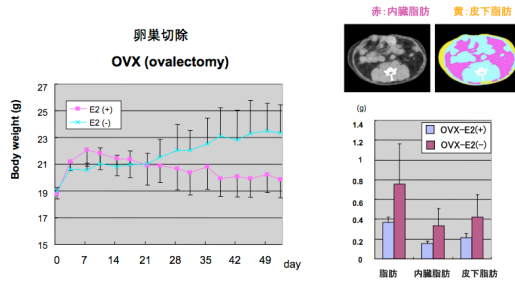


図5 卵巣切除(OVX)マウスはE2投与により脂肪量が減少する

これらの白色脂肪組織 (WAT) の組織像を検討したところ、エストロゲン投与のマウスでは脂肪細胞の大きさが減少していた (図 6)。

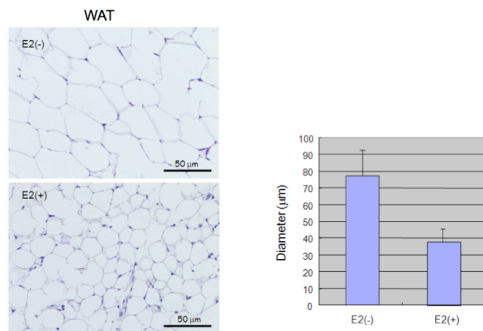


図6 閉経後肥満のモデルマウスでは脂肪細胞が増大する

(7)さらに、白色脂肪組織の内在性 PHB2 の細胞内局在を、免疫組織染色にて検討したところ、エストロゲン無添加食では主に細胞質に局在するのにに対し、エストロゲン添加食では核内に局在していることが示された (図 7)。

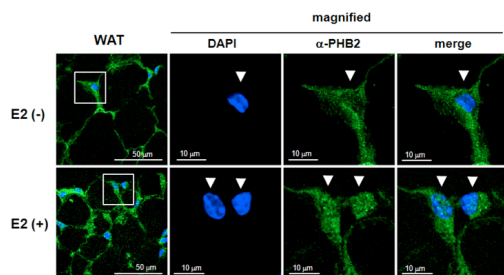


図7 閉経後肥満モデルマウスの白色脂肪細胞では内在性PHB2はE2依存的に核に移行する

(8)以上の結果から、生体においてもエスト

ロゲン依存的に PHB2 はミトコンドリアから核へ移行することを示した。核においては、PHB2 は PGC-1 $\alpha$  に直接結合してその活性を抑制し、PPAR $\gamma$  の活性を抑制することにより脂肪分化を抑制して肥満を抑制することを明らかにした (図 8)。すなわち、エストロゲンの末梢作用において、PHB2 の核局在性の調整を介した肥満の抑制効果を示した。

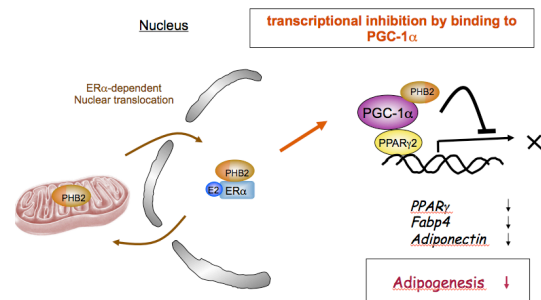


図8 PHB2の核における機能

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Sakashita, E. and Endo, H. SR and SR-related proteins redistribute to segregated fibrillar components of nucleoli in a response to DNA damage. *Nucleus*, 1(4):367-380, 2010 (査読有)  
DOI: 10.4161/nucl.1.4.12683
- ② Kasashima, K., Sumitani, M., and Endo, H. Human mitochondrial transcription factor A is required for the segregation of mitochondrial DNA in cultured cells. *Exp. Cell Res.* 317(2):210-220, 2011 (査読有)  
DOI: 10.1016/j.yexcr.2010.10.008
- ③ Sumitani, M, Kasashima, K, Matsugi, J, Endo, H. Biochemical properties of *Caenorhabditis elegans* HMG-5, a regulator of mitochondrial DNA. *J. Biochem.* 149(5):581-589, 2011 (査読有)  
DOI:10.1093/jb/mvr008
- ④ Kuroiwa, K., Torkai, Y., Osawa, M., Nakashima, T., Nakashima, M., Endo, H., and Arai, T. Epitope determination of anti Thy-1 monoclonal antibodies that regulate neurite outgrowth. *Hybridoma*, 31, 225-232, 2012 (査読有)  
DOI: 10.1089/hyb.2012.0002
- ⑤ Kasashima, K., Sumitani, M., and Endo, H. Maintenance of mitochondrial genome

distribution by mitochondrial AAA+ protein. *ClpX. Exp. Cell Res.* 318, 2335-2343, 2012 (査読有)

DOI: 10.1016/j.yexcr.2012.07.012

- ⑥ Akimoto, C. Sakashita, E., Kasashima, K., Kuroiwa, K., Tominaga, K., Hamamoto, T., and Endo, H. Translational repression of the McKusick-Kaufman syndrome transcript by unique upstream open reading frames encoding mitochondrial proteins with alternative polyadenylation sites. *Biochem Biophys Acta.* 1830, 2728-2738, 2013 (査読有)

DOI: 10.1016/j.bbagen.2012.12.010

[学会発表] (計 13 件)

- ① 坂下英司、遠藤仁司: DNA 損傷応答により SR タンパク質は核小体繊維状部へ移行する。第 12 回 RNA Meeting, 東京, 2010 年 7 月 27 日-29 日 (要旨集 0-40)
- ② 坂下英司、遠藤仁司: CUGBP1 on pyrimidine tract induces exon skipping by preventing exon recognition complex formation of the alternative exon on F1  $\gamma$  pre-mRNA. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会, 神戸, 2010 年 12 月 7 日-10 日 (要旨集 4P-0759)
- ③ 黒岩憲二、大澤麻文、太田恵理子、遠藤仁司、新井孝夫: Thy-1 による神経突起伸張および T 細胞凝集の分子機構、第 33 回日本分子生物学会年会、神戸、2010 年 12 月 07 日~12 月 10 日 (講演プログラム p. 196、演題番号 1P-0470)
- ④ Kasashima, K., Sumitani, M., Endo, H.: Human TFAM is required for the symmetric segregation of mitochondrial DNA in cultured cells. The 7th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine and The 10th Conference of Japanese Society of Mitochondrial Research and Medicine, Fukuoka, 2010 Dec. 16-18, Abstract book p103-104
- ⑤ Kasashima, K., Sumitani, M., Endo, H. Mitochondrial function of AAA+ protein ClpX as a mitochondrial nucleoid factor. The 8th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine and The 11th Conference of Japanese Society of Mitochondrial Research and Medicine, Kagoshima, 2011 Aug. 31- Sep. 4, Abstract book p. 167
- ⑥ Kasashima, K., Endo, H. Oligomeric formation of human TFAM, a diverse regulator of mitochondrial DNA. 第 34

回日本分子生物学会年会、横浜、2011 年 12 月 13-16 日 プログラム集 p. 181 (一般口頭), p. 317 (ポスター)

- ⑦ 中村謙一、太田恵理子、黒岩憲二、遠藤仁司。加齢性難聴モデルマウスを用いた内耳蝸牛プロテオーム解析。日本プロテオーム学会年会、新潟、2011 年 7 月 28-29 日 ポスター発表抄録集 P-48
- ⑧ 中村謙一、太田恵理子、黒岩憲二、遠藤仁司 内耳蝸牛プロテオーム解析による加齢性難聴関連タンパク質の同定。日本生化学会年会、京都、2011 年 9 月 21-24 日 プログラム集 p. 105 (一般口頭)、p. 210 (ポスター)
- ⑨ 坂下英司、遠藤仁司 紫外線照射により核内再分配される SR 蛋白質の動態解析 第 85 回日本生化学会大会、福岡、2012 年 12 月 14 日~12 月 16 日 (3P-470)
- ⑩ 笠嶋克巳、遠藤仁司 Human ClpX regulates the distribution of mitochondrial DNA through TFAM function. 第 35 回日本分子生物学会年会、福岡、2012 年 12 月 11-14 日 プログラム集 p. 326
- ⑪ 笠嶋克巳、遠藤仁司 ミトコンドリアシャペロン ClpX による TFAM 調節機構の解析 第 12 回日本ミトコンドリア学会年会、つくば、2012 年 12 月 19-21 日 プログラム集 p. 49
- ⑫ 黒岩憲二、中島充博、遠藤仁司、新井孝夫: Thy-1 による神経突起伸張および T 細胞凝集を調節するモノクローナル抗体のエピトープ同定、第 35 回日本分子生物学会年会、福岡、2012 年 12 月 11 日~12 月 14 日 (講演プログラム p. 445、演題番号 3P-0366, 3ST4-058)
- ⑬ 遠藤仁司、長尾恭光、笠嶋克巳 生殖細胞とミトコンドリア。第 30 回日本受精着床学会、大阪。2012 年 8 月 30~31 日。プログラム・講演要旨集 p. 128

[図書] (計 1 件)

- ① 遠藤仁司、笠嶋克巳: ミトコンドリア膜の機能的なタンパク質類-プロヒビチン、生体の科学、第 63 巻 5 号、432-433、医学書院、2012  
<http://www.bitway.ne.jp/ejournal/biglobe/2425101344.html>

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: プロヒビチン 2 と PGC1 $\alpha$  との結合を用いた脂肪分化調節剤のスクリーニング方法  
発明者: 遠藤仁司  
権利者: 学校法人自治医科大学  
種類: 特許  
番号: 特願 2010-248139

出願年月日：平成 22 年 11 月 5 日  
国内外の別：国内

○取得状況（計 3 件）

名称：ミトコンドリア膜タンパク質群およびそれらをコードする遺伝子群  
発明者：遠藤仁司  
権利者：学校法人自治医科大学  
種類：特許  
番号：第 4920239 号  
取得年月日：2012 年 2 月 10 日  
国内外の別：国内

名称：プロヒビチン 2 (PHB2) のミトコンドリア機能  
発明者：遠藤仁司・笠嶋克巳  
権利者：学校法人自治医科大学  
種類：特許  
番号：第 4901753 号  
取得年月日：2012 年 1 月 13 日  
国内外の別：国内

名称：Mitochondrial function of prohibitin 2 (PHB2).  
発明者：遠藤仁司・笠嶋克巳  
権利者：学校法人自治医科大学  
種類：特許  
番号：US 8,153,362 B2  
取得年月日：2012 年 4 月 10 日  
国内外の別：国外（米国）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

遠藤 仁司 (ENDO HITOSHI)  
自治医科大学・医学部・教授  
研究者番号：50221817